



704

**PCT** WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

|  |           |   |
|--|-----------|---|
| <b>(51) Internationale Patentklassifikation 5 :</b><br><b>A61K 37/02, C07K 13/00</b>   | <b>A1</b> | <b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> <b>WO 91/07187</b><br><b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 30. Mai 1991 (30.05.91) |
| <b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP90/01864<br><b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 8. November 1990 (08.11.90)<br><br><b>(30) Prioritätsdaten:</b><br>P 39 37 607.9 11. November 1989 (11.11.89) DE<br><br><b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH [DE/DE]; D-6507 Ingelheim am Rhein (DE).<br><br><b>(72) Erfinder; und</b><br><b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) :</b> REUTELINGSPERGER, Christiaan [NL/NL]; Looiersgracht 17, NL-6211 JK Maastricht (NL).<br><br><b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CA, CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), HU, IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US. |           | <b>Veröffentlicht</b><br><i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>  |
| <b>(54) Title:</b> AGENT FOR NEUTRALISING THE PROCOAGULANT ACTIVITY ASSOCIATED WITH TUMOR CELLS<br><b>(54) Bezeichnung:</b> MITTEL ZUR NEUTRALISIERUNG DER TUMORZELLEN-ASSOZIIERTEN PROKOAGULANT-AKTIVITÄT<br><br><b>(57) Abstract</b><br><p>The object of the present invention is the use of an anticoagulant protein of the annexine family as an agent for preventing the metastasis of tumors.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b><br><p>Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines antikoagulierenden Proteins aus der Familie der Annexine als Mittel zur Vermeidung der Metastasierung von Tumoren.</p>  |           |   |

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

|    |                                |    |                                   |    |                                |
|----|--------------------------------|----|-----------------------------------|----|--------------------------------|
| AT | Österreich                     | ES | Spanien                           | MG | Madagaskar                     |
| AU | Australien                     | FI | Finnland                          | ML | Mali                           |
| BB | Barbados                       | FR | Frankreich                        | MN | Mongolei                       |
| BE | Belgien                        | GA | Gabon                             | MR | Mauritanien                    |
| BF | Burkina Faso                   | GB | Vereinigtes Königreich            | MW | Malawi                         |
| BG | Bulgarien                      | GN | Guinea                            | NL | Niederlande                    |
| BJ | Benin                          | GR | Griechenland                      | NO | Norwegen                       |
| BR | Brasilien                      | HU | Ungarn                            | PL | Polen                          |
| CA | Kanada                         | IT | Italien                           | RO | Rumänien                       |
| CF | Zentrale Afrikanische Republik | JP | Japan                             | SD | Sudan                          |
| CG | Kongo                          | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | SE | Schweden                       |
| CH | Schweiz                        | KR | Republik Korea                    | SN | Senegal                        |
| CI | Côte d'Ivoire                  | LI | Liechtenstein                     | SU | Sowjet Union                   |
| CM | Kamerun                        | LK | Sri Lanka                         | TD | Tschad                         |
| DE | Deutschland                    | LU | Luxemburg                         | TC | Togo                           |
| DK | Dänemark                       | MC | Monaco                            | US | Vereinigte Staaten von Amerika |

Mittel zur Neutralisierung der Tumorzellen-assoziierten  
Prokoagulant-Aktivität

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines antikoagulierenden Proteins aus der Familie der Annexine als Mittel zur Vermeidung der Metastasierung von Tumoren.

Als besonderes Problem bei Tumorerkrankungen stellt sich die Ausbildung von Metastasen dar. Den Mechanismus dieses als Metastasierung bezeichneten Phänomens stellt man sich folgendermaßen vor:

Tumorzellen überschwemmen das Zirkulationssystem des Organismus (Intravaskulation) und werden im Blutstrom transportiert. Diese malignen Zellen interagieren mit den Plättchen und den Plasma-Gerinnungsfaktoren und aktivieren das hämostatische System. Die von Tumorzellen bekannte oberflächenabhängige Prokoagulant-Aktivität führt zur Bildung von Thrombin und schließlich zum Fibrinpolymer. Außerdem treten dieselben Zellen auch mit anderen Wirtszellen in Wechselwirkung. Anschließend setzen sich die von Plättchen-Aggregaten und Fibrinfäden umgebenen Tumorzellen in Kapillargefäßen fest. Durch die Ausbildung des Fibringespinnes um die Oberfläche der Tumorzellen werden zudem spezifische Tumor-Antigene verborgen, die sonst eine immunologische Reaktion hervorrufen würden, die die Zerstörung der Tumorzelle zur Folge hätte. Gerade diese Fähigkeit der Tumorzelle, sich selbst mit einem Fibrinnetzwerk zu umgeben, wird daher verantwortlich gemacht für die metastatische Aktivität dieser Zellen. Tumorenzyme greifen daraufhin die Blutgefäßwand proteolytisch an, wodurch die Tumorzellen das Zirkulationssystem verlassen können (Extravaskulation); Sekundärtumore entstehen.

Entscheidend bei diesem Mechanismus ist offensichtlich die Fähigkeit der zirkulierenden Tumorzellen, die Bildung eines Fibrinestromes anzuregen, das dazu dient, die Zelle im Kapillargefäß festzusetzen und/oder sich der Immunabwehr des Organismus zu entziehen. Falanga et al. (Biochemistry 24, 5558-5567 (1985) isolierten und charakterisierten ein spezielles Krebs-Prokoagulant, das in der Lage war, die Koagulation durch Aktivierung des Faktors X auszulösen. Auch andere Krebs-Prokoagulantien, die direkt Faktor X aktivieren, wurden isoliert. Eine Zusammenfassung der Untersuchungen auf dem Gebiet der Aktivierung des Gerinnungssystems durch Tumorzellen findet sich in Cancer Metastasis Reviews 3, 99-116 (1984).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher, einen Wirkstoff bereitzustellen, der gegen die Prokoagulant-Aktivität der Tumorzellen gerichtet ist.

Die Bildung von Fibrin ist der letzte Schritt einer Kaskade enzymatischer Reaktionen, bei denen Thrombin gebildet wird, das letztendlich Fibrinogen in Fibrin umwandelt. Verschiedene prokoagulante Reaktionen wie beispielsweise die Aktivierung von Prothrombin durch die Faktoren Xa und Va werden katalysiert durch Phospholipidoberflächen, an die die Koagulationsfaktoren binden. Nicht jede Art der Phospholipide vermag die Gerinnung zu stimulieren. Die Ladung der Phospholipidoberfläche scheint das Ausmaß des Einflusses zu bestimmen. Negativ geladene Phospholipide wie Phosphatidylserin haben eine hohe prokoagulatorische Wirkung.

Bei den Proteinen, die an Phospholipide binden und mit Phospholipidoberflächen abhängigen Prozessen interferieren, gibt es eine Familie, die in ihrer Bindung an Phospholipide  $\text{Ca}^{2+}$  abhängig sind.

Zu dieser Familie, die auch Annexine genannt wird, gehört neben Lipocortin I, Calpactin I, Protein II, Lipocortin III, p67-Calelectrin auch das Vascular Antikoagulant Protein (VAC) und IBC, PAP, PAP I, PP4, Endonexin II und Lipocortin V. Auch Derivate dieser Proteine weisen solche Eigenschaften auf.

Die gemeinsamen strukturellen Merkmale der Annexine sind wahrscheinlich die Grundlagen für ihre ähnlichen  $\text{Ca}^{2+}$  und Phospholipidbindungseigenschaften. Obwohl diese generelle Eigenschaft für alle Annexine gilt, besteht eine klare Individualität hinsichtlich ihrer Affinität zu  $\text{Ca}^{2+}$  und zu den verschiedenen Phospholipidarten.

Die physiologischen Funktionen der Annexine betreffen membranassoziierte Prozesse. Der grundlegende Mechanismus der gerinnungshemmenden Wirkung des VAC wurde als eine Hemmung der katalytischen Kapazität der Phospholipide durch die Bindung des VAC an ihre Oberfläche erkannt, wodurch die Bildung des gerinnungsfördernden Komplexes an ihrer Oberfläche verhindert wird.

Auch andere Annexine können die Blutgerinnung hemmen, doch scheint VAC der effektivste Inhibitor zu sein.

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß Annexine, insbesondere VAC die Prokoagulant-Aktivität von Tumorzellen inhibieren.

Die Prokoagulant-Aktivität-neutralisierende Wirkung der Annexine wurde an verschiedenen Colo-Tumorzellen nachgewiesen. Die Prokoagulant-Aktivität einer bestimmten Menge Colozellen wurde von  $\text{VAC}\alpha$  in dosisabhängiger Weise inhibiert (Fig. 2). Aus der

Beziehung zwischen der Zellmenge und der Gerinnungszeit (Fig. 1) wurde errechnet, daß 210 nM VAC $\alpha$ , 99% der Prokoagulant-Aktivität von  $6 \times 10^6$  Zellen/ml neutralisieren. Wurden durch VAC $\alpha$  neutralisierte Colozellen in Gegenwart von Ca $^{2+}$  zentrifugiert und anschließend mit TBSA gewaschen, zeigten sie keine Prokoagulant-Aktivität im Koagulationsassay. Enthielt die Flüssigkeit jedoch anstelle von Ca $^{2+}$  EDTA, so zeigten die Zellen normale Prokoagulant-Aktivität.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß VAC $\alpha$  die Tumorzellen assoziierte Prokoagulant-Aktivität neutralisiert, indem es Ca $^{2+}$ -abhängig an Oberflächenstellen bindet, die eine entscheidende Rolle für diese Prokoagulant-Aktivität spielen. Sehr wahrscheinlich sind also Phospholipide an der Tumorzellen assoziierten Prokoagulant-Aktivität beteiligt, da bisher keine anderen Oberflächenrezeptoren für VAC $\alpha$  nachgewiesen wurden.

VAC $\alpha$  inhibiert also die Prokoagulant-Aktivität von Tumorzellen, indem es an die Stellen der Oberfläche von Tumorzellen gebunden wird, die bei der Initiierung und/oder Propagierung der Reaktionen beteiligt sind, die zu Thrombin und letztendlich zur Fibrinbildung führen. Da neben VAC $\alpha$  auch die anderen Annexine in Ca $^{2+}$  abhängiger Weise an Phospholipide binden, dürften die mit VAC $\alpha$  erhaltenen Ergebnisse auch auf diese übertragbar sein.

Dadurch, daß die Annexine die den Tumorzellen eigene Prokoagulant-Aktivität hemmen, verhindern sie die Einkapselung der Tumorzellen in ein Fibrinnetz; eine für die metastatische Aktivität der Tumorzellen unbedingte Notwendigkeit. Aufgrund der neutralisierenden Wirkung sind die Annexine daher in der Lage, die Metastasierung von Tumorzellen zu

verhindern und stellen daher potente Wirkstoffe mit anti-metastatischer Aktivität dar. Als ein solcher Wirkstoff ist insbesondere VAC geeignet.

Die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe wird daher durch die Verwendung eines antikoagulierenden Proteins aus der Familie der Annexine gelöst.

Die erfindungsgemäß einsetzbaren Wirkstoffe, insbesondere VAC können nicht nur in freier Form, sondern auch in Form ihrer Salze, insbesondere ihrer pharmazeutisch annehmbaren Salze, vorliegen. Da sie mehrere Aminosäurereste mit freien Aminogruppen enthalten, können die erfindungsgemäßen Verbindungen z.B. in Form von Säureadditionssalzen vorliegen. Als Säureadditionssalze kommen insbesondere physiologisch verträgliche Salze mit üblichen, therapeutisch anwendbaren Säuren in Betracht; als anorganische Säuren sind die Halogenwasserstoffsäuren, wie die Chlorwasserstoffsäure, aber auch Schwefelsäure und Phosphor- bzw. Pyrophosphorsäure zu nennen; als organische Säuren sind in erster Linie Sulfonsäuren, wie die Benzol- oder p-Toluosulfonsäure oder Niederalkansulfonsäuren, wie Methansulfonsäure, sowie Carbonsäuren, wie Essigsäuren, Milchsäure, Palmitin- und Stearinsäure, Äpfelsäure, Weinsäure, Ascorbinsäure und Citronensäure geeignet. Da die Verbindungen auch Aminosäurereste mit freien Carboxylgruppen enthalten, können sie auch als Metallsalz, insbesondere als Alkalimetall- oder Erdalkalimetallsalz, z.B. Natrium-, Calcium- oder Magnesiumsalz, oder auch als Ammoniumsalz, abgeleitet von Ammoniak oder einer physiologisch verträglichen, organischen stickstoffhaltigen Base, vorliegen. Da sie aber

zugleich freie Carboxylgruppen und freie Aminogruppen enthalten, können sie auch als inneres Salz vorliegen.

Die erfindungsgemäßen Mittel können z. B. parenteral, wie intravenös, intracutan, subcutan oder intramuskulär, oder topisch verabreicht werden.

Die Größe der Einzeldosen sowie das Verabreichungsschema kann am besten anhand einer individuellen Beurteilung des jeweiligen Krankheitsfalles bestimmt werden: die dazu erforderlichen Methoden zur Bestimmung von relevanten Faktoren sind dem Fachmann geläufig. Im Normalfall liegt bei einer Injektion die therapeutisch wirksame Menge der erfindungsgemäßen Arzneimittel im Dosisbereich von etwa 0,005 bis etwa 0,5 mg/kg Körpergewicht. Bevorzugt wird der Bereich von etwa 0,01 mg/kg bis etwa 0,1 mg/kg, besonders bevorzugt von etwa 0,01 bis etwa 0,05 mg/kg Körpergewicht. Die Verabreichung erfolgt durch intravenöse, intramuskuläre oder subcutane Injektion. Dementsprechend enthalten pharmazeutische Präparate zur parenteralen Verabreichung in Einzeldosis-Form in Abhängigkeit von der Applikationsart pro Dosis etwa 0,4 bis etwa 7,5 mg des Wirkstoffes. Die erfindungsgemäßen Arzneimittel enthalten neben den Wirkstoffen gegebenenfalls noch einen Puffer, z. B. einen Phosphatpuffer, der den pH-Wert zwischen etwa 3,5 und 8 halten soll, und ferner Natriumchlorid, Mannit oder Sorbit zur Einstellung der Isotonie. Sie können in gefriergetrockneter oder gelöster Form vorliegen, wobei Lösungen ein antibakteriell wirkendes Konservierungsmittel, z. B. 0,2 bis 0,3 % 4-Hydroxybenzoesäuremethylester oder -ethylester, enthalten können. Ein Präparat für die topische Anwendung kann als wäßrige Lösung, Lotion oder Gelee, ölige Lösung oder Suspension, oder fetthaltige



oder insbesondere Emulsions-Salbe vorliegen. Ein Präparat in Form einer wäßrigen Lösung erhält man beispielsweise dadurch, daß man die erfindungsgemäßen Wirkstoffe in einer wäßrigen Pufferlösung von pH 4 bis 6,5 löst und gewünschtenfalls einen weiteren Wirkstoff, z. B. ein Antiinflammatorikum, und/oder ein polymeres Haftmittel, z. B. Polyvinylpyrrolidon, und/oder ein Konservierungsmittel zufügt. Die Konzentration des Wirkstoffs beträgt etwa 0,1 bis etwa 1,5 mg, vorzugsweise 0,25 bis 1,0 mg, in 10 ml einer Lösung bzw. 10 g eines Geles.

Eine ölige Applikationsform für die topische Verabreichung erhält man beispielsweise durch Suspendieren der erfindungsgemäßen Wirkstoffe in einem Öl, gegebenfalls unter Zusatz von Quellmitteln, wie Aluminiumstearat, und/oder grenzflächenaktiven Mitteln (Tensiden), deren HLB-Wert ("hydrophilic-lipophilic-balance") unter 10 liegt, wie Fettsäuremonoester mehrwertiger Alkohole, z. B. Glycerinmonostearat, Sorbitanmonolaurat, Sorbitanmonostearat oder Sorbitanmonooleat. Eine fetthaltige Salbe erhält man z.B. durch Suspendieren der erfindungsgemäßen Wirkstoffe in einer streichbaren Fettgrundlage, gegebenenfalls unter Zusatz eines Tensids vom HLB-Wert unter 10. Eine Emulsionssalbe erhält man durch Verreiben einer wäßrigen Lösung der erfindungsgemäßen Wirkstoffe in einer weichen, streichbaren Fettunterlage unter Zusatz eines Tensids, dessen HLB-Wert unter 10 liegt. Die topischen Applikationsformen können auch Konservierungsmittel enthalten. Die Konzentration des Wirkstoffes beträgt 0,1 bis 1,5 mg, vorzugsweise 0,25 bis 1,0 mg, in etwa 10 g der Grundmasse.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein:

Mittel aus der Gruppe der Annexine und seine natürlich vorkommenden oder synthetisch oder gentechnisch hergestellten Derivate oder Analoga, gegebenenfalls mit Hilfs- und/oder Trägerstoffen und/oder Stabilisatoren zur Neutralisierung der Tumorzellen-assoziierten Prokoagulant-Aktivität;

Mittel zur Neutralisierung der Tumorzellen-assoziierten Prokoagulant-Aktivität, dadurch gekennzeichnet, daß das Annexin der Formel

|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
| 1   | 5   | 10  | 15  |
| Met | Ala | Gln | Val |
| 20  | 25  | 30  |     |
| Asp | Glu | Arg | Ala |
| 35  | 40  | 45  |     |
| Leu | Gly | Thr | Asp |
| 50  | 55  | 60  |     |
| Ser | Asn | Ala | Gln |
| 65  | 70  | 75  |     |
| Phe | Gly | Arg | Asp |
| 80  | 85  | 90  |     |
| Lys | Phe | Glu | Lys |
| 95  | 100 | 105 |     |
| Tyr | Asp | Ala | Tyr |
| 110 | 115 | 120 |     |
| Asn | Glu | Lys | Val |

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 125   | 130 | 135 |
| Glu Leu Arg Ala Ile Lys Gln Val Tyr Glu Glu Glu Tyr Gly Ser |     |     |
| 140   | 145 | 150 |
| Ser Leu Glu Asp Asp Val Val Gly Asp Thr Ser Gly Tyr Tyr Gln |     |     |
| 155   | 160 | 165 |
| Arg Met Leu Val Val Leu Leu Gln Ala Asn Arg Asp Pro Asp Ala |     |     |
| 170   | 175 | 180 |
| Gly Ile Asp Glu Ala Gln Val Glu Gln Asp Ala Gln Ala Leu Phe |     |     |
| 185   | 190 | 195 |
| Gln Ala Gly Glu Leu Lys Trp Gly Thr Asp Glu Glu Lys Phe Ile |     |     |
| 200   | 205 | 210 |
| Thr Ile Phe Gly Thr Arg Ser Val Ser His Leu Arg Lys Val Phe |     |     |
| 215   | 220 | 225 |
| Asp Lys Tyr Met Thr Ile Ser Gly Phe Gln Ile Glu Glu Thr Ile |     |     |
| 230   | 235 | 240 |
| Asp Arg Glu Thr Ser Gly Asn Leu Glu Gln Leu Leu Leu Ala Val |     |     |
| 245   | 250 | 255 |
| Val Lys Ser Ile Arg Ser Ile Pro Ala Tyr Leu Ala Glu Thr Leu |     |     |
| 260   | 265 | 270 |
| Tyr Tyr Ala Met Lys Gly Ala Gly Thr Asp Asp His Thr Leu Ile |     |     |
| 275   | 280 | 285 |
| Arg Val Met Val Ser Arg Ser Glu Ile Asp Leu Phe Asn Ile Arg |     |     |
| 290   | 295 | 300 |
| Lys Glu Phe Arg Lys Asn Phe Ala Thr Ser Leu Tyr Ser Met Ile |     |     |

305 310 315  
 Lys Gly Asp Thr Ser Gly Asp Tyr Lys Lys Ala Leu Leu Leu Leu  
 320  
 Cys Gly Glu Asp Asp. \*

entspricht, wobei XX für Glu oder Asp steht und gegebenenfalls an Position 1 das Methionin abgespalten ist und das Alanin an Position 2 gegebenenfalls blockiert ist und/oder wobei gegebenenfalls Aggregationen durch beispielsweise intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen an Position 316 vorliegen oder seinen biologisch aktiven Varianten oder Derivaten entspricht gegebenenfalls mit Hilfs- und/oder Trägerstoffen und/oder Stabilisatoren.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist weiterhin ein:

Antikoagulanz aus der Gruppe der Annexine und seine natürlich vorkommenden oder synthetisch oder gentechnisch hergestellten Derivate oder Analoga, gegebenenfalls mit Hilfs- und/oder Trägerstoffen und/oder Stabilisatoren zur Vermeidung der Metastasierung von Tumoren;

Arzneimittel zur Vermeidung der Metastasierung von Tumoren, dadurch gekennzeichnet, daß das Antikoagulanz der Formel

```

      1           5           10           15
Met Ala Gln Val Leu Arg Gly Thr Val Thr Asp Phe Pro Gly Phe

      20           25           30
Asp Glu Arg Ala Asp Ala XX Thr Leu Arg Lys Ala Met Lys Gly

      35           40           45
Leu Gly Thr Asp Glu Glu Ser Ile Leu Thr Leu Leu Thr Ser Arg

```

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 50  | 55  | 60  |
| Ser Asn Ala Gln Arg Gln Glu Ile Ser Ala Ala Phe Lys Thr Leu |     |     |
| 65  | 70  | 75  |
| Phe Gly Arg Asp Leu Leu Asp Asp Leu Lys Ser Glu Leu Thr Gly |     |     |
| 80  | 85  | 90  |
| Lys Phe Glu Lys Leu Ile Val Ala Leu Met Lys Pro Ser Arg Leu |     |     |
| 95  | 100 | 105 |
| Tyr Asp Ala Tyr Glu Leu Lys His Ala Leu Lys Gly Ala Gly Thr |     |     |
| 110   | 115 | 120 |
| Asn Glu Lys Val Leu Thr Glu Ile Ile Ala Ser Arg Thr Pro Glu |     |     |
| 125   | 130 | 135 |
| Glu Leu Arg Ala Ile Lys Gln Val Tyr Glu Glu Glu Tyr Gly Ser |     |     |
| 140   | 145 | 150 |
| Ser Leu Glu Asp Asp Val Val Gly Asp Thr Ser Gly Tyr Tyr Gln |     |     |
| 155   | 160 | 165 |
| Arg Met Leu Val Val Leu Leu Gln Ala Asn Arg Asp Pro Asp Ala |     |     |
| 170   | 175 | 180 |
| Gly Ile Asp Glu Ala Gln Val Glu Gln Asp Ala Gln Ala Leu Phe |     |     |
| 185   | 190 | 195 |
| Gln Ala Gly Glu Leu Lys Trp Gly Thr Asp Glu Glu Lys Phe Ile |     |     |
| 200   | 205 | 210 |
| Thr Ile Phe Gly Thr Arg Ser Val Ser His Leu Arg Lys Val Phe |     |     |
| 215   | 220 | 225 |
| Asp Lys Tyr Met Thr Ile Ser Gly Phe Gln Ile Glu Glu Thr Ile |     |     |

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 230   | 235 | 240 |
| Asp Arg Glu Thr Ser Gly Asn Leu Glu Gln Leu Leu Leu Ala Val |     |     |
| 245   | 250 | 255 |
| Val Lys Ser Ile Arg Ser Ile Pro Ala Tyr Leu Ala Glu Thr Leu |     |     |
| 260   | 265 | 270 |
| Tyr Tyr Ala Met Lys Gly Ala Gly Thr Asp Asp His Thr Leu Ile |     |     |
| 275   | 280 | 285 |
| Arg Val Met Val Ser Arg Ser Glu Ile Asp Leu Phe Asn Ile Arg |     |     |
| 290   | 295 | 300 |
| Lys Glu Phe Arg Lys Asn Phe Ala Thr Ser Leu Tyr Ser Met Ile |     |     |
| 305   | 310 | 315 |
| Lys Gly Asp Thr Ser Gly Asp Tyr Lys Lys Ala Leu Leu Leu Leu |     |     |
| 320   |     |     |
| Cys Gly Glu Asp Asp *                                       |     |     |

entspricht, wobei XX für Glu oder Asp steht und gegebenenfalls an Position 1 das Methionin abgespalten ist und das Alanin an Position 2 gegebenenfalls blockiert ist und/oder wobei gegebenenfalls Aggregationen durch beispielsweise intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen an Position 316 vorliegen oder seinen biologisch aktiven Varianten oder Derivaten entspricht gegebenenfalls mit Hilfs- und/oder Trägerstoffen und/oder Stabilisatoren.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die: Verwendung eines Antikoagulanz aus der Gruppe der Annexine und seiner natürlich vorkommenden oder synthetisch oder gentechnisch hergestellten Derivate oder Analoga, gegebenenfalls mit Hilfs- und/oder Trägerstoffen und/oder Stabilisatoren zur Vermeidung der Metastasierung von Tumoren;

Verwendung eines Antikoagulanz aus der Gruppe der Annexine und seiner natürlich vorkommenden oder synthetisch oder gentechnisch hergestellten Derivate oder Analoga, gegebenenfalls mit Hilfs- und/oder Trägerstoffen und/oder Stabilisatoren zur Vermeidung der Metastasierung, wobei das Antikoagulanz der Formel

|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
| 1   | 5   | 10  | 15  |
| Met | Ala | Gln | Val |
| Leu | Arg | Gly | Thr |
| Val | Thr | Asp | Phe |
| Pro | Gly | Phe |     |
| 20  | 25  | 30  |     |
| Asp | Glu | Arg | Ala |
| Asp | Ala | XX  | Thr |
| Leu | Arg | Lys | Ala |
| Met | Lys | Gly |     |
| 35  | 40  | 45  |     |
| Leu | Gly | Thr | Asp |
| Glu | Glu | Ser | Ile |
| Leu | Thr | Leu | Leu |
| Thr | Ser | Arg |     |
| 50  | 55  | 60  |     |
| Ser | Asn | Ala | Gln |
| Arg | Gln | Glu | Ile |
| Ser | Ala | Ala | Phe |
| Lys | Thr | Leu |     |
| 65  | 70  | 75  |     |
| Phe | Gly | Arg | Asp |
| Leu | Leu | Asp | Asp |
| Leu | Lys | Ser | Glu |
| Leu | Thr | Gly |     |
| 80  | 85  | 90  |     |
| Lys | Phe | Glu | Lys |
| Leu | Ile | Val | Ala |
| Leu | Met | Lys | Pro |
| Ser | Arg | Leu |     |
| 95  | 100 | 105 |     |
| Tyr | Asp | Ala | Tyr |
| Glu | Leu | Lys | His |
| Ala | Leu | Lys | Gly |
| Ala | Gly | Thr |     |
| 110 | 115 | 120 |     |
| Asn | Glu | Lys | Val |
| Leu | Thr | Glu | Ile |
| Ile | Ala | Ser | Arg |
| Thr | Pro | Glu |     |
| 125 | 130 | 135 |     |
| Glu | Leu | Arg | Ala |
| Ile | Lys | Gln | Val |
| Tyr | Glu | Glu | Glu |
| Tyr | Gly | Ser |     |
| 140 | 145 | 150 |     |
| Ser | Leu | Glu | Asp |
| Asp | Val | Val | Gly |
| Asp | Thr | Ser | Gly |
| Tyr | Tyr | Gln |     |

155 160 165  
Arg Met Leu Val Val Leu Leu Gln Ala Asn Arg Asp Pro Asp Ala  
170 175 180  
Gly Ile Asp Glu Ala Gln Val Glu Gln Asp Ala Gln Ala Leu Phe  
185 190 195  
Gln Ala Gly Glu Leu Lys Trp Gly Thr Asp Glu Glu Lys Phe Ile  
200 205 210  
Thr Ile Phe Gly Thr Arg Ser Val Ser His Leu Arg Lys Val Phe  
215 220 225  
Asp Lys Tyr Met Thr Ile Ser Gly Phe Gln Ile Glu Glu Thr Ile  
230 235 240  
Asp Arg Glu Thr Ser Gly Asn Leu Glu Gln Leu Leu Leu Ala Val  
245 250 255  
Val Lys Ser Ile Arg Ser Ile Pro Ala Tyr Leu Ala Glu Thr Leu  
260 265 270  
Tyr Tyr Ala Met Lys Gly Ala Gly Thr Asp Asp His Thr Leu Ile  
275 280 285  
Arg Val Met Val Ser Arg Ser Glu Ile Asp Leu Phe Asn Ile Arg  
290 295 300  
Lys Glu Phe Arg Lys Asn Phe Ala Thr Ser Leu Tyr Ser Met Ile  
305 310 315  
Lys Gly Asp Thr Ser Gly Asp Tyr Lys Lys Ala Leu Leu Leu Leu  
320  
Cys Gly Glu Asp Asp \*



entspricht, wobei XX für Glu oder Asp steht und gegebenenfalls an Position 1 das Methionin abgespalten ist und das Alanin an Position 2 gegebenenfalls blockiert ist und/oder wobei gegebenenfalls Aggregationen durch beispielsweise intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen an Position 316 vorliegen oder seinen biologisch aktiven Varianten oder Derivaten entspricht;

Verwendung eines Antikoagulanz aus der Gruppe der Annexine und seiner natürlich vorkommenden oder synthetisch oder gentechnisch hergestellten Derivate oder Analoga zur Herstellung eines Arzneimittels zur Vermeidung der Metastasierung von Tumoren;

Verwendung eines Antikoagulanz aus der Gruppe der Annexine und seiner natürlich vorkommenden oder synthetisch oder gentechnisch hergestellten Derivate oder Analoga zur Herstellung eines Arzneimittels zur Vermeidung der Metastasierung, wobei das Antikoagulanz der Formel

|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
| 1   | 5   | 10  | 15  |
| Met | Ala | Gln | Val |
| Leu | Arg | Gly | Thr |
| Val | Thr | Asp | Phe |
| Pro | Gly | Phe |     |
| 20  | 25  | 30  |     |
| Asp | Glu | Arg | Ala |
| Asp | Ala | XX  | Thr |
| Leu | Arg | Lys | Ala |
| Met | Lys | Gly |     |
| 35  | 40  | 45  |     |
| Leu | Gly | Thr | Asp |
| Glu | Glu | Ser | Ile |
| Leu | Thr | Leu | Leu |
| Thr | Ser | Arg |     |
| 50  | 55  | 60  |     |
| Ser | Asn | Ala | Gln |
| Arg | Gln | Glu | Ile |
| Ser | Ala | Ala | Phe |
| Lys | Thr | Leu |     |
| 65  | 70  | 75  |     |
| Phe | Gly | Arg | Asp |
| Leu | Leu | Asp | Asp |
| Leu | Lys | Ser | Glu |
| Leu | Thr | Gly |     |

16

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 80  | 85  | 90  |
| Lys Phe Glu Lys Leu Ile Val Ala Leu Met Lys Pro Ser Arg Leu |     |     |
| 95  | 100 | 105 |
| Tyr Asp Ala Tyr Glu Leu Lys His Ala Leu Lys Gly Ala Gly Thr |     |     |
| 110   | 115 | 120 |
| Asn Glu Lys Val Leu Thr Glu Ile Ile Ala Ser Arg Thr Pro Glu |     |     |
| 125   | 130 | 135 |
| Glu Leu Arg Ala Ile Lys Gln Val Tyr Glu Glu Glu Tyr Gly Ser |     |     |
| 140   | 145 | 150 |
| Ser Leu Glu Asp Asp Val Val Gly Asp Thr Ser Gly Tyr Tyr Gln |     |     |
| 155   | 160 | 165 |
| Arg Met Leu Val Val Leu Leu Gln Ala Asn Arg Asp Pro Asp Ala |     |     |
| 170   | 175 | 180 |
| Gly Ile Asp Glu Ala Gln Val Glu Gln Asp Ala Gln Ala Leu Phe |     |     |
| 185   | 190 | 195 |
| Gln Ala Gly Glu Leu Lys Trp Gly Thr Asp Glu Glu Lys Phe Ile |     |     |
| 200   | 205 | 210 |
| Thr Ile Phe Gly Thr Arg Ser Val Ser His Leu Arg Lys Val Phe |     |     |
| 215   | 220 | 225 |
| Asp Lys Tyr Met Thr Ile Ser Gly Phe Gln Ile Glu Glu Thr Ile |     |     |
| 230   | 235 | 240 |
| Asp Arg Glu Thr Ser Gly Asn Leu Glu Gln Leu Leu Leu Ala Val |     |     |
| 245   | 250 | 255 |
| Val Lys Ser Ile Arg Ser Ile Pro Ala Tyr Leu Ala Glu Thr Leu |     |     |

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 260   | 265 | 270 |
| Tyr Tyr Ala Met Lys Gly Ala Gly Thr Asp Asp His Thr Leu Ile |     |     |
| 275   | 280 | 285 |
| Arg Val Met Val Ser Arg Ser Glu Ile Asp Leu Phe Asn Ile Arg |     |     |
| 290   | 295 | 300 |
| Lys Glu Phe Arg Lys Asn Phe Ala Thr Ser Leu Tyr Ser Met Ile |     |     |
| 305   | 310 | 315 |
| Lys Gly Asp Thr Ser Gly Asp Tyr Lys Lys Ala Leu Leu Leu Leu |     |     |
| 320   |     |     |
| Cys Gly Glu Asp Asp *                                       |     |     |

entspricht, wobei XX für Glu oder Asp steht und gegebenenfalls an Position 1 das Methionin abgespalten ist und das Alanin an Position 2 gegebenenfalls blockiert ist und/oder wobei gegebenenfalls Aggregationen durch beispielsweise intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen an Position 316 vorliegen oder seinen biologisch aktiven Varianten oder Derivaten entspricht.

Das nachfolgende Beispiel soll die Erfindung erläutern, ohne sie jedoch einzuschränken.

## Materialien und Methoden

VAC $\alpha$  wurde entweder analog EPA 0 181 465 oder EPA 0 293 567 hergestellt. Die nachfolgenden Untersuchungen wurden mit VAC $\alpha$  durchgeführt. Die Ergebnisse dürften jedoch auch auf die anderen Annexine, insbesondere auf VACB übertragbar sein.

Colo Tumorzellen wurden in Gewebekolben in RPMI 1640, supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum kultiviert. Die Zellen wurden geerntet, indem der Boden des Kolbens mit einem Gummiwischer abgewischt wurde. Die gesammelten Zellen wurden mit einem TBSA-Puffer gewaschen (50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 4,5 mg Glukose/ml, 0,5 mg Bovines Serumalbumin/ml, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,9) und schließlich für die Untersuchungen in diesem Puffer suspendiert. Die Lebensfähigkeit dieser Zellen wurde mit Tryptan-Blau Exklusion getestet. Mehr als 95% der Zellen waren nach dieser Prozedur lebensfähig.

Koagulations Assay: Die Prokoagulant-Aktivität der Colozellen wurde gemessen, indem eine bestimmte Anzahl gewaschener Zellen 50  $\mu$ l zitriertem Plättchen-freiem-Plasma (PFP) zugegeben wurde. Diese Mischung wurde zwei Minuten bei 37°C gerührt. Koagulation wurde durch Zugabe von CaCl<sub>2</sub> (Endkonzentration war 10 mM) ausgelöst. Das Endvolumen der Mischung betrug 500  $\mu$ l. Koagulation wurde turbidimetrisch mit einem "Payton dual wave aggregometer" beobachtet.

## Ergebnisse

### Colozellen assoziierte Prokoagulant-Aktivität:

Wurden gewaschene Colozellen zitriertem PFP zugegeben und das Plasma wurde recalcifiziert, so konnte eine Gerinnungszeit beobachtet werden, die von der Anzahl der anwesenden Zellen abhing (Fig. 1). In Abwesenheit der Zellen betrug die Gerinnungszeit mehr als 15 Minuten, während  $8 \times 10^6$  Zellen/ml diese Gerinnungszeit auf etwa zwei Minuten reduzierte. Diese Prokoagulant-Aktivität wurde durch die intakten Zellen hervorgerufen; Zentrifugation der Zellen ergab eine Kopräzipitation der Prokoagulant-Aktivität.

### Neutralisation der Colozellen assoziierten Prokoagulant-Aktivität durch VAC $\alpha$ :

Die Prokoagulant-Aktivität einer bestimmten Menge Colozellen wurde von VAC $\alpha$  in dosisabhängiger Weise inhibiert (Fig. 2). Aus der Beziehung zwischen der Zellmenge und der Gerinnungszeit (Fig. 1) wurde errechnet, daß 210 nM VAC $\alpha$  99% der Prokoagulant-Aktivität von  $6 \times 10^6$  Zellen/ml neutralisieren. Wurden durch VAC $\alpha$  neutralisierte Colozellen in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  zentrifugiert und anschließend mit TBSA gewaschen, zeigten sie keine Prokoagulant-Aktivität im Koagulationsassay. Enthielt die Flüssigkeit jedoch anstelle von  $\text{Ca}^{2+}$  EDTA, so zeigten die Zellen normale Prokoagulant-Aktivität.

### Legende zu den Figuren

#### Fig. 1

Colozellen assoziierte Prokoagulant-Aktivität. Zitriertes Plättchen-freies-Plasma (PFP) wurde mit TBSA, enthaltend die angegebene Anzahl an Colozellen, verdünnt. Nach einer Inkubation von 3 Min. bei 37°C wurde  $\text{CaCl}_2$  (Endkonzentration 10 mM) zugegeben und die Gerinnungszeit registriert.

#### Fig. 2

Effekt von  $\text{VAC}\alpha$  auf die Prokoagulant-Aktivität von Colozellen. Zitriertes Plättchen-freies-Plasma (PFP) wurde mit TBSA, die angegebene Menge an  $\text{VAC}\alpha$  und eine bestimmte Anzahl an Colozellen enthaltend (bis zu einer Endkonzentration von  $6 \times 10^6$  Zellen/ml), verdünnt. Nach Inkubation von 3 Min. bei 37°C wurde die Koagulation durch Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  (Endkonzentration 10 mM) ausgelöst. Die gemessene Gerinnungszeit wurde bezogen auf Fig. 1 und auf die Anzahl von prokoagulant-aktiven Colozellen extrapoliert.

## Patentansprüche

1. Antikoagulanz aus der Gruppe der Annexine und seine natürlich vorkommenden oder synthetisch oder gentechnisch hergestellten Derivate oder Analoga, gegebenenfalls mit Hilfs- und/oder Trägerstoffen und/oder Stabilisatoren zur Vermeidung der Metastasierung von Tumoren.
2. Arzneimittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Antikoagulanz der Formel

|   |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|
| 1   | 5   | 10  | 15  |
| Met Ala Gln Val Leu Arg Gly Thr Val Thr Asp Phe Pro Gly Phe |     |     |     |
|   | 20  | 25  | 30  |
| Asp Glu Arg Ala Asp Ala XX Thr Leu Arg Lys Ala Met Lys Gly  |     |     |     |
|   | 35  | 40  | 45  |
| Leu Gly Thr Asp Glu Glu Ser Ile Leu Thr Leu Leu Thr Ser Arg |     |     |     |
|   | 50  | 55  | 60  |
| Ser Asn Ala Gln Arg Gln Glu Ile Ser Ala Ala Phe Lys Thr Leu |     |     |     |
|   | 65  | 70  | 75  |
| Phe Gly Arg Asp Leu Leu Asp Asp Leu Lys Ser Glu Leu Thr Gly |     |     |     |
|   | 80  | 85  | 90  |
| Lys Phe Glu Lys Leu Ile Val Ala Leu Met Lys Pro Ser Arg Leu |     |     |     |
|   | 95  | 100 | 105 |
| Tyr Asp Ala Tyr Glu Leu Lys His Ala Leu Lys Gly Ala Gly Thr |     |     |     |
|   | 110 | 115 | 120 |
| Asn Glu Lys Val Leu Thr Glu Ile Ile Ala Ser Arg Thr Pro Glu |     |     |     |

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 125   | 130 | 135 |
| Glu Leu Arg Ala Ile Lys Gln Val Tyr Glu Glu Glu Tyr Gly Ser |     |     |
| 140   | 145 | 150 |
| Ser Leu Glu Asp Asp Val Val Gly Asp Thr Ser Gly Tyr Tyr Gln |     |     |
| 155   | 160 | 165 |
| Arg Met Leu Val Val Leu Leu Gln Ala Asn Arg Asp Pro Asp Ala |     |     |
| 170   | 175 | 180 |
| Gly Ile Asp Glu Ala Gln Val Glu Gln Asp Ala Gln Ala Leu Phe |     |     |
| 185   | 190 | 195 |
| Gln Ala Gly Glu Leu Lys Trp Gly Thr Asp Glu Glu Lys Phe Ile |     |     |
| 200   | 205 | 210 |
| Thr Ile Phe Gly Thr Arg Ser Val Ser His Leu Arg Lys Val Phe |     |     |
| 215   | 220 | 225 |
| Asp Lys Tyr Met Thr Ile Ser Gly Phe Gln Ile Glu Glu Thr Ile |     |     |
| 230   | 235 | 240 |
| Asp Arg Glu Thr Ser Gly Asn Leu Glu Gln Leu Leu Leu Ala Val |     |     |
| 245   | 250 | 255 |
| Val Lys Ser Ile Arg Ser Ile Pro Ala Tyr Leu Ala Glu Thr Leu |     |     |
| 260   | 265 | 270 |
| Tyr Tyr Ala Met Lys Gly Ala Gly Thr Asp Asp His Thr Leu Ile |     |     |
| 275   | 280 | 285 |
| Arg Val Met Val Ser Arg Ser Glu Ile Asp Leu Phe Asn Ile Arg |     |     |
| 290   | 295 | 300 |
| Lys Glu Phe Arg Lys Asn Phe Ala Thr Ser Leu Tyr Ser Met Ile |     |     |



Lys Gly Asp Thr Ser Gly Asp Tyr Lys Lys Ala Leu Leu Leu Leu  
Cys Gly Glu Asp Asp \*

entspricht, wobei XX für Glu oder Asp steht und gegebenenfalls an Position 1 das Methionin abgespalten ist und das Alanin an Position 2 gegebenenfalls blockiert ist und/oder wobei gegebenenfalls Aggregationen durch beispielsweise intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen an Position 316 vorliegen oder seinen biologisch aktiven Varianten oder Derivaten entspricht gegebenenfalls mit Hilfs- und/oder Trägerstoffen und/oder Stabilisatoren.

3. Verwendung eines Antikoagulanz aus der Gruppe der Annexine und seiner natürlich vorkommenden oder synthetisch oder gentechnisch hergestellten Derivate oder Analoga, gegebenenfalls mit Hilfs- und/oder Trägerstoffen und/oder Stabilisatoren zur Vermeidung der Metastasierung von Tumoren.
4. Verwendung eines Antikoagulanz gemäß Anspruch 3, wobei das Antikoagulanz der Formel

```

      1              5              10              15
Met Ala Gln Val Leu Arg Gly Thr Val Thr Asp Phe Pro Gly Phe

      20              25              30
Asp Glu Arg Ala Asp Ala XX  Thr Leu Arg Lys Ala Met Lys Gly

      35              40              45
Leu Gly Thr Asp Glu Glu Ser Ile Leu Thr Leu Leu Thr Ser Arg

```

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 50  | 55  | 60  |
| Ser Asn Ala Gln Arg Gln Glu Ile Ser Ala Ala Phe Lys Thr Leu |     |     |
| 65  | 70  | 75  |
| Phe Gly Arg Asp Leu Leu Asp Asp Leu Lys Ser Glu Leu Thr Gly |     |     |
| 80  | 85  | 90  |
| Lys Phe Glu Lys Leu Ile Val Ala Leu Met Lys Pro Ser Arg Leu |     |     |
| 95  | 100 | 105 |
| Tyr Asp Ala Tyr Glu Leu Lys His Ala Leu Lys Gly Ala Gly Thr |     |     |
| 110   | 115 | 120 |
| Asn Glu Lys Val Leu Thr Glu Ile Ile Ala Ser Arg Thr Pro Glu |     |     |
| 125   | 130 | 135 |
| Glu Leu Arg Ala Ile Lys Gln Val Tyr Glu Glu Glu Tyr Gly Ser |     |     |
| 140   | 145 | 150 |
| Ser Leu Glu Asp Asp Val Val Gly Asp Thr Ser Gly Tyr Tyr Gln |     |     |
| 155   | 160 | 165 |
| Arg Met Leu Val Val Leu Leu Gln Ala Asn Arg Asp Pro Asp Ala |     |     |
| 170   | 175 | 180 |
| Gly Ile Asp Glu Ala Gln Val Glu Gln Asp Ala Gln Ala Leu Phe |     |     |
| 185   | 190 | 195 |
| Gln Ala Gly Glu Leu Lys Trp Gly Thr Asp Glu Glu Lys Phe Ile |     |     |
| 200   | 205 | 210 |
| Thr Ile Phe Gly Thr Arg Ser Val Ser His Leu Arg Lys Val Phe |     |     |
| 215   | 220 | 225 |
| Asp Lys Tyr Met Thr Ile Ser Gly Phe Gln Ile Glu Glu Thr Ile |     |     |
| 230   | 235 | 240 |
| Asp Arg Glu Thr Ser Gly Asn Leu Glu Gln Leu Leu Leu Ala Val |     |     |

25

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 245   | 250 | 255 |
| Val Lys Ser Ile Arg Ser Ile Pro Ala Tyr Leu Ala Glu Thr Leu |     |     |
| 260   | 265 | 270 |
| Tyr Tyr Ala Met Lys Gly Ala Gly Thr Asp Asp His Thr Leu Ile |     |     |
| 275   | 280 | 285 |
| Arg Val Met Val Ser Arg Ser Glu Ile Asp Leu Phe Asn Ile Arg |     |     |
| 290   | 295 | 300 |
| Lys Glu Phe Arg Lys Asn Phe Ala Thr Ser Leu Tyr Ser Met Ile |     |     |
| 305   | 310 | 315 |
| Lys Gly Asp Thr Ser Gly Asp Tyr Lys Lys Ala Leu Leu Leu Leu |     |     |
| 320   |     |     |
| Cys Gly Glu Asp Asp *                                       |     |     |

entspricht, wobei XX für Glu oder Asp steht und gegebenenfalls an Position 1 das Methionin abgespalten ist und das Alanin an Position 2 gegebenenfalls blockiert ist und/oder wobei gegebenenfalls Aggregationen durch beispielsweise intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen an Position 316 vorliegen oder seinen biologisch aktiven Varianten oder Derivaten entspricht.

5. Verwendung eines Antikoagulanz aus der Gruppe der Annexine und seiner natürlich vorkommenden oder synthetisch oder gentechnisch hergestellten Derivate oder Analoga zur Herstellung eines Arzneimittels zur Vermeidung der Metastasierung von Tumoren.
6. Verwendung eines Antikoagulanz gemäß Anspruch 5, wobei das Antikoagulanz der Formel

26

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1   | 5   | 10  | 15  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Met | Ala | Gln | Val | Leu | Arg | Gly | Thr | Val | Thr | Asp | Phe | Pro | Gly | Phe |
| 20  | 25  | 30  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Asp | Glu | Arg | Ala | Asp | Ala | XX  | Thr | Leu | Arg | Lys | Ala | Met | Lys | Gly |
| 35  | 40  | 45  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Leu | Gly | Thr | Asp | Glu | Glu | Ser | Ile | Leu | Thr | Leu | Leu | Thr | Ser | Arg |
| 50  | 55  | 60  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser | Asn | Ala | Gln | Arg | Gln | Glu | Ile | Ser | Ala | Ala | Phe | Lys | Thr | Leu |
| 65  | 70  | 75  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Phe | Gly | Arg | Asp | Leu | Leu | Asp | Asp | Leu | Lys | Ser | Glu | Leu | Thr | Gly |
| 80  | 85  | 90  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Lys | Phe | Glu | Lys | Leu | Ile | Val | Ala | Leu | Met | Lys | Pro | Ser | Arg | Leu |
| 95  | 100 | 105 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Tyr | Asp | Ala | Tyr | Glu | Leu | Lys | His | Ala | Leu | Lys | Gly | Ala | Gly | Thr |
| 110 | 115 | 120 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Asn | Glu | Lys | Val | Leu | Thr | Glu | Ile | Ile | Ala | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu |
| 125 | 130 | 135 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Glu | Leu | Arg | Ala | Ile | Lys | Gln | Val | Tyr | Glu | Glu | Glu | Tyr | Gly | Ser |
| 140 | 145 | 150 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser | Leu | Glu | Asp | Asp | Val | Val | Gly | Asp | Thr | Ser | Gly | Tyr | Tyr | Gln |
| 155 | 160 | 165 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Arg | Met | Leu | Val | Val | Leu | Leu | Gln | Ala | Asn | Arg | Asp | Pro | Asp | Ala |
| 170 | 175 | 180 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Ile | Asp | Glu | Ala | Gln | Val | Glu | Gln | Asp | Ala | Gln | Ala | Leu | Phe |

27

|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
|     | 185 | 190 | 195 |
| Gln | Ala | Gly | Glu |
| Leu | Lys | Trp | Gly |
| Thr | Asp | Glu | Glu |
| Lys | Phe | Ile |     |
|     | 200 | 205 | 210 |
| Thr | Ile | Phe | Gly |
| Thr | Arg | Ser | Val |
| Ser | His | Leu | Arg |
| Lys | Val | Phe |     |
|     | 215 | 220 | 225 |
| Asp | Lys | Tyr | Met |
| Thr | Ile | Ser | Gly |
| Phe | Gln | Ile | Glu |
| Glu | Thr | Ile |     |
|     | 230 | 235 | 240 |
| Asp | Arg | Glu | Thr |
| Ser | Gly | Asn | Leu |
| Glu | Gln | Leu | Leu |
| Leu | Ala | Val |     |
|     | 245 | 250 | 255 |
| Val | Lys | Ser | Ile |
| Arg | Ser | Ile | Pro |
| Ala | Tyr | Leu | Ala |
| Glu | Thr | Leu |     |
|     | 260 | 265 | 270 |
| Tyr | Tyr | Ala | Met |
| Lys | Gly | Ala | Gly |
| Thr | Asp | Asp | His |
| Thr | Leu | Ile |     |
|     | 275 | 280 | 285 |
| Arg | Val | Met | Val |
| Ser | Arg | Ser | Glu |
| Ile | Asp | Leu | Phe |
| Asn | Ile | Arg |     |
|     | 290 | 295 | 300 |
| Lys | Glu | Phe | Arg |
| Lys | Asn | Phe | Ala |
| Thr | Ser | Leu | Tyr |
| Ser | Met | Ile |     |
|     | 305 | 310 | 315 |
| Lys | Gly | Asp | Thr |
| Ser | Gly | Asp | Tyr |
| Lys | Lys | Ala | Leu |
| Leu | Leu | Leu | Leu |
|     | 320 |     |     |
| Cys | Gly | Glu | Asp |
| Asp | *   |     |     |

entspricht, wobei XX für Glu oder Asp steht und gegebenenfalls an Position 1 das Methionin abgespalten ist und das Alanin an Position 2 gegebenenfalls blockiert ist und/oder wobei gegebenenfalls Aggregationen durch beispielsweise intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den

Cysteinen an Position 316 vorliegen oder seinen biologisch aktiven Varianten oder Derivaten entspricht.

7. Mittel aus der Gruppe der Annexine und seine natürlich vorkommenden oder synthetisch oder gentechnisch hergestellten Derivate oder Analoga, gegebenenfalls mit Hilfs- und/oder Trägerstoffen und/oder Stabilisatoren zur Neutralisierung der Tumorzellen-assoziierten Prokoagulant-Aktivität..
8. Mittel nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Antikoagulanz der Formel

|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
| 1   | 5   | 10  | 15  |
| Met | Ala | Gln | Val |
| 20  | 25  | 30  |     |
| Asp | Glu | Arg | Ala |
| 35  | 40  | 45  |     |
| Leu | Gly | Thr | Asp |
| 50  | 55  | 60  |     |
| Ser | Asn | Ala | Gln |
| 65  | 70  | 75  |     |
| Phe | Gly | Arg | Asp |
| 80  | 85  | 90  |     |
| Lys | Phe | Glu | Lys |
| 95  | 100 | 105 |     |
| Tyr | Asp | Ala | Tyr |
| 110 | 115 | 120 |     |
| Asn | Glu | Lys | Val |

|   |                         |     |
|---|-------------------------|-----|
| 125   | 130                     | 135 |
| Glu Leu Arg Ala Ile Lys Gln Val Tyr                         | Glu Glu Glu Tyr Gly Ser |     |
| 140   | 145                     | 150 |
| Ser Leu Glu Asp Asp Val Val Gly Asp Thr Ser Gly Tyr Tyr Gln |                         |     |
| 155   | 160                     | 165 |
| Arg Met Leu Val Val Leu Leu Gln Ala Asn Arg Asp Pro Asp Ala |                         |     |
| 170   | 175                     | 180 |
| Gly Ile Asp Glu Ala Gln Val Glu Gln Asp Ala Gln Ala Leu Phe |                         |     |
| 185   | 190                     | 195 |
| Gln Ala Gly Glu Leu Lys Trp Gly Thr Asp Glu Glu Lys Phe Ile |                         |     |
| 200   | 205                     | 210 |
| Thr Ile Phe Gly Thr Arg Ser Val Ser His Leu Arg Lys Val Phe |                         |     |
| 215   | 220                     | 225 |
| Asp Lys Tyr Met Thr Ile Ser Gly Phe Gln Ile Glu Glu Thr Ile |                         |     |
| 230   | 235                     | 240 |
| Asp Arg Glu Thr Ser Gly Asn Leu Glu Gln Leu Leu Leu Ala Val |                         |     |
| 245   | 250                     | 255 |
| Val Lys Ser Ile Arg Ser Ile Pro Ala Tyr Leu Ala Glu Thr Leu |                         |     |
| 260   | 265                     | 270 |
| Tyr Tyr Ala Met Lys Gly Ala Gly Thr Asp Asp His Thr Leu Ile |                         |     |
| 275   | 280                     | 285 |
| Arg Val Met Val Ser Arg Ser Glu Ile Asp Leu Phe Asn Ile Arg |                         |     |
| 290   | 295                     | 300 |
| Lys Glu Phe Arg Lys Asn Phe Ala Thr Ser Leu Tyr Ser Met Ile |                         |     |

30

305 310 315  
Lys Gly Asp Thr Ser Gly Asp Tyr Lys Lys Ala Leu Leu Leu Leu  
320  
Cys Gly Glu Asp Asp \*

entspricht, wobei XX für Glu oder Asp steht und gegebenenfalls an Position 1 das Methionin abgespalten ist und das Alanin an Position 2 gegebenenfalls blockiert ist und/oder wobei gegebenenfalls Aggregationen durch beispielsweise intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen an Position 316 vorliegen oder seinen biologisch aktiven Varianten oder Derivaten entspricht gegebenenfalls mit Hilfs- und/oder Trägerstoffen und/oder Stabilisatoren.



Fig. 1

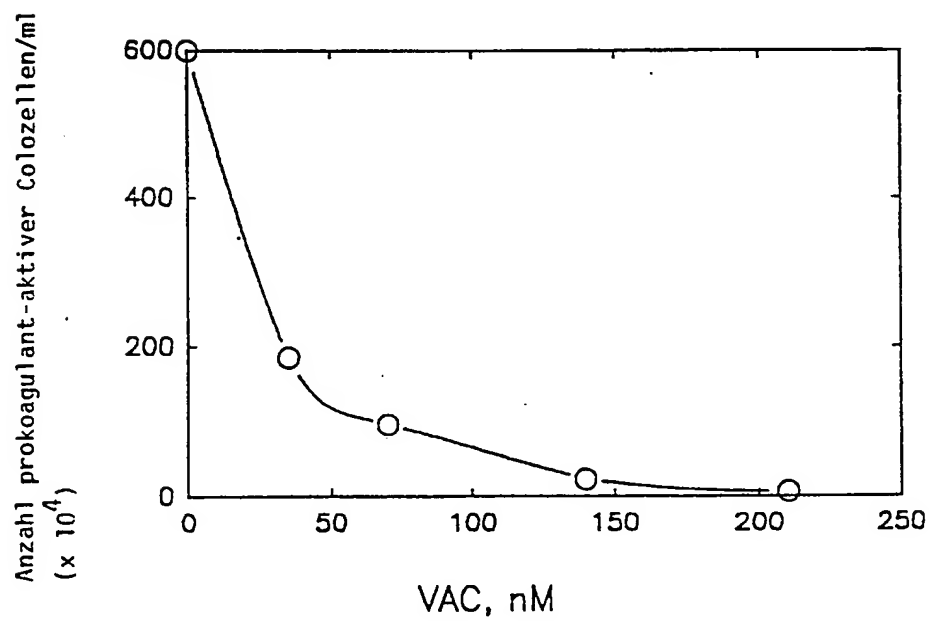
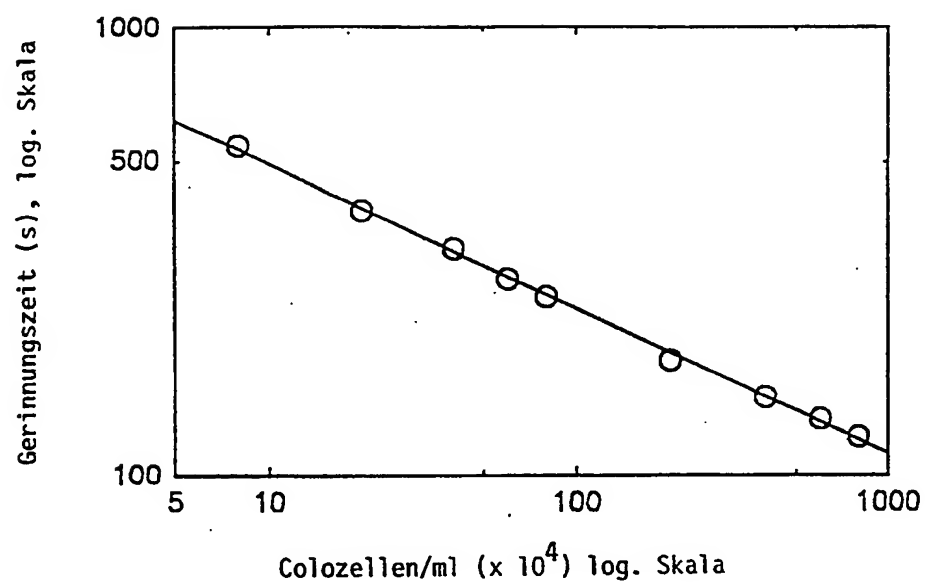


Fig. 2

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP90/01864

## I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) \*

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int. Cl.<sup>5</sup>: A61K 37/02, C07K 13/00

## II. FIELDS SEARCHED

| Classification System  | Minimum Documentation Searched <sup>7</sup> |
|------------------------|---|
| Int. Cl. <sup>5</sup>  | A61K, C07K                                  |
| Classification Symbols |   |

Documentation Searched other than Minimum Documentation  
to the extent that such Documents are included in the Fields Searched <sup>8</sup>

## III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>9</sup>

| Category <sup>10</sup> | Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>   | Relevant to Claim No. <sup>13</sup> |
|------------------------|--|-------------------------------------|
| X                      | WO, A, 8807576 (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GmbH) 6 October 1988, see the whole document (cited in the application)   | 1,2,7,8                             |
| Y                      |  | 1,2,5-8                             |
| Y                      | Kitasato Arch. of Exp. Med., vol. 60, No. 3, 1987, H. Maruyama et al.: "A study on the anticoagulant and fibrinolytic activities of a crude fucoidan from the edible brown seaweed laminaria religiosa, with special reference to its inhibitory effect on the growth of sarcoma-180 ascites cells subcutaneously implanted into mice", pages 105-121 see the whole document | 1,2,5-8                             |

\* Special categories of cited documents: <sup>10</sup>

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Δ" document member of the same patent family

## IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search

30 January 1991(30.01.91)

Date of Mailing of this International Search Report:

26 February 1991(26.02.91)

International Searching Authority

European Patent Office

Signature of Authorizer/ Officer

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

P, A The Journal of Immunology, vol. 145, No. 1,  
1 July 1990, The American Association of Immunol-  
ogists, (US), T. Sakata et al.: "The role of  
lipocortin I in macrophage-mediated immunos-  
uppression in tumor-bearing mice", pages 387-396

V. ☐ OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE <sup>1</sup>

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. ☒ Claim numbers 3, 4 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

see PCT - rule 39.1 (iv) :

Methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy,  
as well as diagnostic methods.

2. ☐ Claim numbers ..... because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed require-  
ments to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claim numbers ..... because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of  
PCT Rule 6.4(a).

VI. ☐ OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING <sup>2</sup>

This international Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims  
of the international application.
2. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only  
those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:
3. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to  
the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:
4. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not  
invite payment of any additional fee.

## Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

EP 9001864  
SA 41346

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

EPO FORM P0479

**For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82**

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 90/01864

|  |   |  |
|--|---|--|
| <b>I. KLASSEFIZKATION DES ANMELDUNGS-GEGENSTANDS</b> (bei mehreren Klassefizierungssymbolen sind alle anzugeben) <sup>6</sup>  |   |  |
| Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassefizierung und der IPC   |   |  |
| Int.Cl. <sup>5</sup> A 61 K 37/02, C 07 K 13/00  |   |  |
| <b>II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE</b>   |   |  |
| Recherchierter Mindestprüfstoff <sup>7</sup>   |   |  |
| Klassefizierungssystem   | Klassefizierungssymbole   |  |
| Int.Cl. <sup>5</sup>   | A 61 K, C 07 K  |  |
| Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen <sup>8</sup>   |   |  |
|  |   |  |
| <b>III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN<sup>9</sup></b>  |   |  |
| Art*   | Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>  | Betr. Anspruch Nr. <sup>13</sup>                   |
| X  | WO, A, 8807576 (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GmbH)<br>6. Oktober 1988<br>siehe das ganze Dokument<br>in der Anmeldung erwähnt   | 1, 2, 7, 8   |
| Y  | ---   | 1, 2, 5-8  |
| Y  | Kitasato Arch. of Exp. Med., Band 60, Nr. 3, 1987,<br>H. Maruyama et al.: "A study on the anticoagulant and fibrinolytic activities of a crude fucoidan from the edible brown seaweed laminaria religiosa, with special reference to its inhibitory effect on the growth of sarcoma-180 ascites cells subcutaneously implanted into mice", Seiten 105-121<br>siehe das ganze Dokument | 1, 2, 5-8  |
| --- ./. .  |   |  |
| <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen<sup>10</sup>:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> |   |  |
| <b>IV. BESCHEINIGUNG</b>   |   |  |
| Datum des Abschlusses der internationalen Recherche  |   | Absenddatum des internationalen Recherchenberichts |
| 30. Januar 1991  |   | 26 FEB 1991  |
| Internationale Recherchenbehörde   |   | Unterschrift des bevollmächtigten Beauftragten     |
| Europäisches Patentamt   |   | MISS T. TAZELAAR                                   |

## WEITERE ANGABEN ZU BLATT 2

P,A The Journal of Immunology, Band 145, Nr. 1,  
1. Juli 1990, The American Association  
of Immunologists, (US),  
T. Sakata et al.: "The role of lipocortin  
I in macrophage-mediated immunosuppression  
in tumor-bearing mice", Seiten 387-396

-----

V. BEMERKUNGEN ZU DEN ANSPRÜCHEN, DIE SICH ALS NICHT RECHERCHIERBAR ERWIESEN HABEN<sup>1</sup>

Gemäß Artikel 17 Absatz 2 Buchstabe a sind bestimmte Ansprüche aus folgenden Gründen nicht Gegenstand der internationalen Recherche gewesen:

1. ☒ Ansprüche Nr. 3,4, weil sie sich auf Gegenstände beziehen, die zu recherchieren die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

Siehe PCT-Regel 39.1(iv):

Verfahren zur chirurgischen oder therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers sowie Diagnostizierverfahren.

2. ☐ Ansprüche Nr. ...., weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. ☐ Ansprüche Nr. ...., weil sie abhängige Ansprüche und nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) PCT abgefaßt sind.

VI. BEMERKUNGEN BEI MANGELNDER EINHEITLICHKEIT DER ERFINDUNG<sup>2</sup>

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich der internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich der internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren gezahlt worden sind, nämlich
3. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; sie ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
4. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche eine Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde eine solche Gebühr nicht verlangt.

Bemerkung hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT  
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 9001864

SA 41346

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 19/02/91

Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentedokument | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie | Datum der<br>Veröffentlichung |
|---|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO-A- 8807576                                       | 06-10-88                      | DE-A- 3710309                     | 09-02-89                      |
|   |                               | DE-A- 3710364                     | 19-01-89                      |
|   |                               | DE-A- 3710430                     | 19-01-89                      |
|   |                               | DE-A- 3737367                     | 24-05-89                      |
|   |                               | AU-A- 1402788                     | 29-09-88                      |
|   |                               | EP-A- 0293567                     | 07-12-88                      |
|   |                               | JP-T- 1503515                     | 30-11-89                      |
| -----   |                               |                                   |                               |

EPO FORM P0473

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**